

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler, Research and Development PT. Arara Abadi, Desa Pinang Sebatang, Kecamatan Tualang, Kabupaten Siak, Riau. Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan mulai dari bulan Januari 2015 sampai Mei 2015.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah botol untuk penanaman eksplan, *chemical double respirator*, pinset, *scalpel*, lampu spirtus, *sterilizer*, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, *tissue sterile*, *shaker*, *beat rotor*, *invertor*, *freezer*, *waterbath*, *sentrifuge*, *microwave*, neraca analitik, *nano drop*, *vacum*, pemanas elektrik, *mikrotube sterile*, mesin *thermal cycler* PCR CFX9600 (Bio-rad), Gel doc (Bio-rad), mikropipet berbagai ukuran, dan kamera. Bahan yang digunakan yaitu eksplan *E. Pellita* dipilih dari tanaman yang superior yang berasal dari PT. Arara Abadi, *Ethyl Methane Sulphonate* (EMS), air destilasi steril, media E5, Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah *cluster* ekplan *E. Pellita*, CTAB, Buffer Tris-HCl, EDTA, NaCl, Etanol, Isopropanol dingin, Klorofom, dan Isoamylalkohol. Bahan untuk elektroforesis dan PCR adalah *Hot Star Taq Plus Master Kit Mix* (Qiagen), *Primer*, *Coral load*, air steril bebas *nuclease*, *agarose*, *Buffer TAE 1x*, *loading Dye*, dan DNA marker 100 bp.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi EMS dengan 5 taraf (C1: 0.00 %, C2: 0.50 %, C3: 1.00 %, C4: 1.50 %, C5: 2.00%) sedangkan faktor kedua durasi perendaman yaitu D1:30 menit dan D2:60 menit. Jumlah total perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali ulangan, masing-masing perlakuan terdiri dari 10 tanaman, maka jumlah seluruh sampel pada penelitian ini adalah 400 tanaman.



Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Diarangi mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Pra penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga 25 Maret 2015, yaitu melakukan proses kultur jaringan dan subkultur serta menyesuaikan dengan standar operasional di laboratorium biologi molekuler R&D Sinarmas. Melakukan percobaan penanaman *node* yang dianggap efektif untuk penelitian ini, percobaan botol tanam yang sesuai untuk penanaman, percobaan larutan campuran EMS (*buffer* atau air destilasi steril), percobaan proses pembilasan eksplan hasil perendaman EMS, dan memultiplikasi eksplan yang akan digunakan agar lebih *juvenile* dan seragam.

Secara garis besar tahapan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1. Penelitian ini terdiri dari penyiapan eksplan, perlakuan eksplan dengan EMS, penanaman dan pemeliharaan, pengamatan fenotipe, dan isolasi DNA. Berikut ini akan diuraikan masing-masing tahapan penelitian tersebut yaitu sebagai berikut :

1. Penyiapan eksplan, eksplan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tetua superior berumur 30 hari pada media multiplikasi yang selanjutnya di inisiasi dengan panjang $\pm 0,5$ mm pada bagian *node* pertama dan kedua yang akan dikompositkan.
2. Perendaman dengan EMS dan Penanaman

Untuk membuat larutan EMS dalam penelitian ini ialah dengan mencampurkan air destilasi yang telah disterilkan dengan EMS. Untuk detailnya dapat di lihat pada tabel berikut :

Tabel 3.1 Larutan konsentrasi EMS Siap pakai

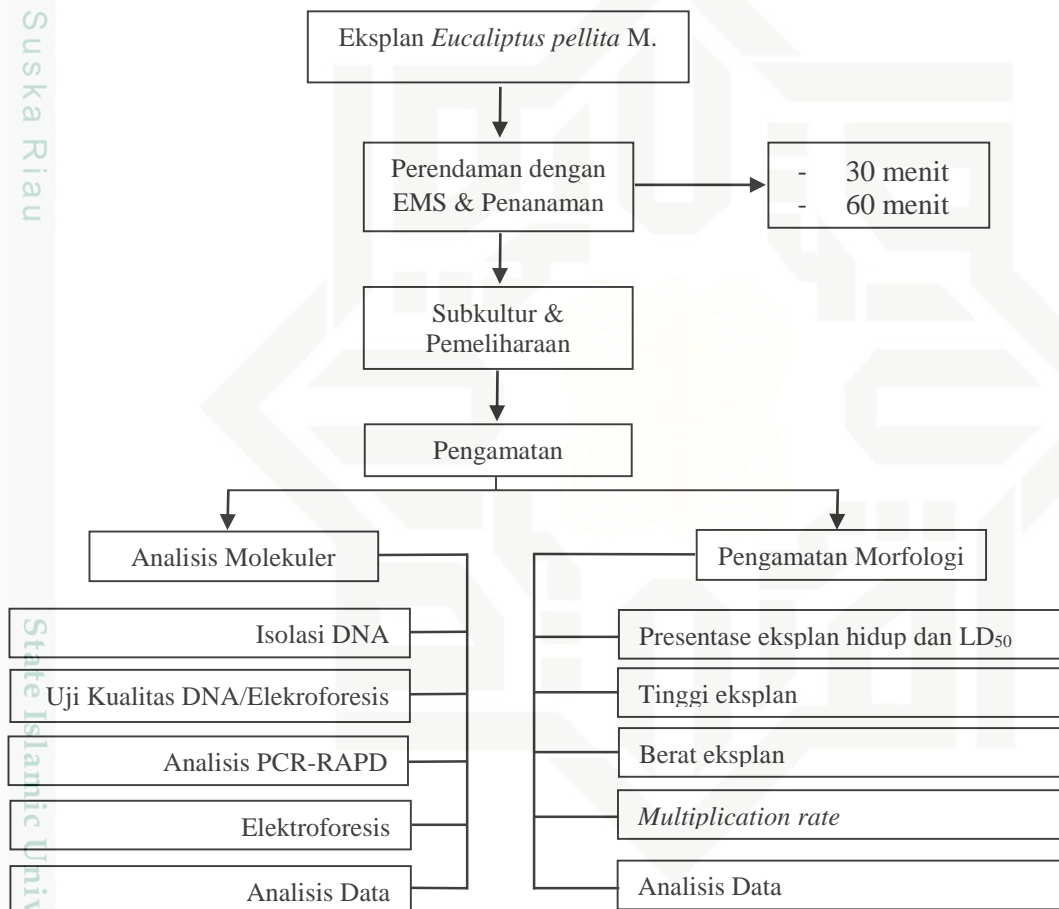
Konsentrasi	EMS	Air Destilasi Steril
0 %	-	1000 μl
0.50 %	5 μl	995 μl
1.00 %	10 μl	990 μl
1.50 %	15 μl	985 μl
2.00 %	20 μl	980 μl

Perendaman dilakukan pada *tube* 2 mL sebanyak 10 *tube*. Selanjutnya 5 *tube* yang telah berisi komposit *node* 1 dan 2 sebanyak 40 *node* per *tube* direndam larutan EMS 0,50-2.00 % selama 30 menit, dan diteruskan 5 *tube* selanjutnya untuk durasi perendaman 60 menit, Proses perendaman dan pembilasan pertama dilakukan didalam lemari asam dan empat pembilasan selanjutnya dilakukan di

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

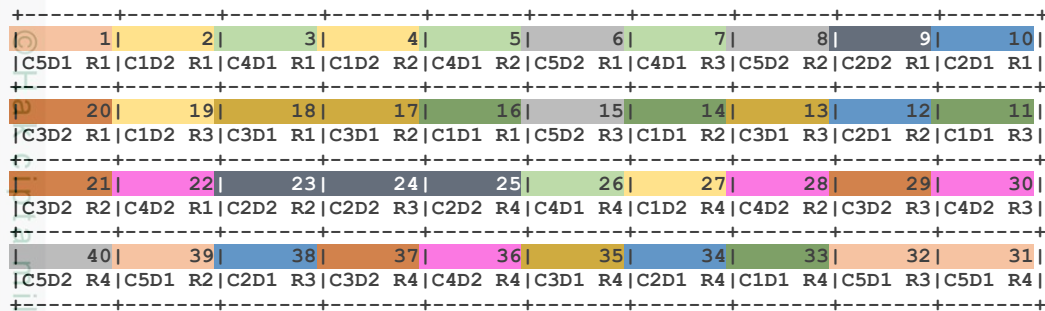
laminar air flow cabinet. Sebelum ditanaman pada media multiplikasi E5, *node* ditiriskan pada *tissue sterile*. *Node* ditanam dalam posisi tegak dan setiap botol terdiri dari 5 *node*, setiap ulangan perlakuan terdiri dari 2 botol media E5. Dan selanjutnya di letakkan pada *growth room* dengan letak botol sesuai dengan pengacakan petak rancangan penelitian menggunakan *software STAR-Statistical Tool for Agricultural Research* versi 2.0.1. dari *International Rice Research Institute* (IRRI). Untuk lebih detailnya dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1. Alur Pelaksanaan Penelitian

3. Subkultur dan Pemeliharaan

Subkultur dilakukan 21 hari setelah penanaman awal hingga 3 kali subkultur atau 7 minggu. Adapun beberapa kegiatan pemeliharaan ialah penyemprotan alkohol disekitar petakan penelitian agar meminimalisir kontaminasi yang tinggi, membuang ekplan yang terkontaminasi.



Gambar 3.2. Petak rancangan penelitian

Keterangan :

- C1 : Konsentrasi 0.00 % D1 : Durasi 30 menit
 C2 : Konsentrasi 0.50 % D2 : Durasi 60 menit
 C3 : Konsentrasi 1.00 %
 C4 : Konsentrasi 1.50 %
 C5 : Konsentrasi 2.00 %

4. Pengamatan Morfologi

a. Persentase eksplan hidup dan LD₅₀

Pengamatan persentase eksplan hidup ataupun *survival* dilakukan mulai 1 Minggu Setelah Tanama (MST) sampai 7 MST, indikasi kriteria pengamatan *survival* ditandai dengan warna eksplan kehijauan ataupun kemerahan. Perhitungannya dilakukan dengan membagi jumlah seluruh eksplan yang masih hidup setelah perendaman EMS dengan jumlah seluruh eksplan yang direndam EMS kemudian dikalikan dengan 100%. Pengamatan terhadap persentase eksplan hidup dilakukan untuk memperoleh nilai LD₅₀ konsentrasi EMS. Dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang hidup dibagi jumlah total eksplan, pada masing-masing durasi perendaman, untuk tiap taraf konsentrasi perendaman. Pengamatan dilakukan pengamatan minggu ke VIII atau minggu terakhir. Pada penelitian terdahulu tentang induksi mutasi secara *In Vitro* *Saintpaulia* dengan EMS, Fang (2011) melakukan pengamatan LD 50 pada minggu ke 4 dan minggu ke 8 setelah pengaplikasian EMS.

b. Tinggi eksplan

Pengamatan tinggi eksplan dilakukan pada 7 MST, adapun teknis pengukuran ialah dengan menanam eksplan rapat dengan sisi botol media pada subkultur ke 2 atau pengamatan 6 MST sehingga pengukuran dapat dilakukan dengan cara

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Diarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

menempelkan penggaris pada sisi botol dan memilih eksplan tertinggi pada tiap propagul dan diukur mulai dari pangkal eksplan hingga ujung tunas apikal.

c. Berat eksplan

Pengamatan berat eksplan dilakukan pada 7 MST, menggunakan neraca analitik dengan teknis memindahkan tiap propagul secara perlahan ke dalam botol media baru yang sudah dalam keadaan tara kemudian mencatat hasilnya dan begitu seterusnya hingga 400 propagul dalam keadaan yang diupayakan tetap steril.

d. *Multiplication rate*

Pengamatan *multiplication rate* atau tingkat pertambahan tunas dilakukan pada 1 MST sampai 7 MST. Rosmaina (2010). Menyatakan bahwa formulasi untuk menghitung potensi jumlah tanaman yang dapat dihasilkan secara teoritis dalam satu periode (satu tahun), dengan rumus $Y = A^n \times B \times F1 \times F2 \times F3$, dimana Y adalah jumlah planlet/tanaman yang dapat dihasilkan, A adalah jumlah tunas yang dihasilkan pada setiap periode subkultur (faktor multiplikasi), B adalah jumlah eksplan awal yang tumbuh (dianggap 3 ekplan), n adalah jumlah subkultur pada periode tertentu (pertahun), F1, F2, dan F3 berturut-turut adalah persentase keberhasilan kultur pada saat multiplikasi tunas, pada saat pengakaran, dan pada saat aklimatisasi.

e. Analisis Data

Model linear Rancangan Acak Lengkap dua faktorial menurut Mattjik dan Sumertajaya (2006) adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana:

Y_{ijk} : Pengamatan faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-dan pada ulangan ke- k

μ : Rataan umum

α_i : Pengaruh konsentrasi EMS pada taraf ke- i

β_j : Pengaruh klon EP pada taraf ke- j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi dari konsentrasi EMS pada taraf ke- i dan klon EP pada taraf ke- j

ϵ_{ijk} : Pengaruh galat percobaan

Data hasil pengamatan yang diperoleh dilakukan uji *Analysis of Variance* (ANOVA), perlakuan yang berbeda nyata akan dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT), semua perhitungan tersebut dilakukan dengan program STAR - *Statistical Tool for Agricultural Research* versi 2.0.1. dari *International Rice Research Institute* (IRRI).

LD₅₀ benih; pengamatan terhadap persentase tanaman mati dilakukan untuk memperoleh nilai LD₅₀ sinar gamma pada tanaman. Dihitung berdasarkan jumlah tanaman yang mati, untuk tiap taraf dosis radiasi. Pengamatan dilakukan mulai 1 MSI sampai 3 MSI (minggu setelah iradiasi).

Letal dosis dihitung dengan model regresi linear sebagai berikut :

(Sumber : Qing-He li et al, 2012)

$$LD_{50} = a + bx$$

$$D_{50} = \frac{LD_{50} - a}{b}$$

Keterangan :

b : Koefisien Regresi

a : Konstan

D₅₀ : Letal Dosis

5. Analisis Molekuler

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA tanaman dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. Buffer ekstraksi dibiarkan dalam *water bath* pada suhu 65° C, lalu timbang sample (daun ekplan 7 MST) ±100 mg, masukkan sampel dalam *tube* 2 mL beserta *beator* dan 1 mL *chloroform* serta tambahkan 12,5 µl RNase A, vortex sampel dan inkubasi pada suhu 60° C – 65° C selama 15 menit, sesekali di *mixing* perlahan, ekstrak dengan menambahkan *chloroform* : *isoamylalcohol* (24:1), *mix* selama 10 menit, sentrifus dengan kecepatan 7.500 rpm selama 8 menit, pindahkan *supernatant* kedalam tube 1,5 mL dan tambahkan *chloroform* : *isoamylalcohol* (24:1) dengan volume yang sama, *mix* pada suhu ruangan selama 10 menit, sentrifus pada kecepatan 7.500 rpm selama 8 menit, pindahkan 600 µl *supernatant* kedalam tube 1,5 mL dan tambahkan *cold-isopropanol* dengan volume yang sama, *mix* perlahan dengan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

membolak-balikkan *tube* selama 1-2 menit dan amatilah pelletnya, sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit untuk memadatkan pellet, cuci pellet dengan 5 mL 76 % Et.OH, Sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit, ulangi sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit (opsional), keringkan pellet dan larutkan dengan menambahkan 1 mL TE dan inkubasi pada suhu 65° C selama 30 menit.

Selanjutnya dilakukan uji kualitas DNA dilakukan dengan cara elektroforesis gel agarose dengan konsentrasi 0.8% w/v ditambah dengan larutan etidium bromide ($5 \cdot 10^{-2} \mu\text{L mL}^{-1}$), (terdapat 0.4 gram agarose didalam 50 ml TAE 1x). Sampel (4 μL loading dye + 4 μL DNA hasil isolasi), masukkan ke dalam sumur yang ada di gel. Elektroforesis DNA dilakukan pada 100 V selama 60 menit.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan GaneAmp 9700 (Bio-rad). Pengaturan mesin PCR adalah sebagai berikut *pre-denaturation* 95°C selama 5 menit, diikuti 39 siklus yang terdiri *denaturation* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 37°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extention* pada suhu 72°C selama 8 menit.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose konsentrasi 1% (w/v), dan setiap contoh sampel (5 μL DNA + 4 μL loading dye) dimasukkan kedalam sumur agarose dan salah satu lubang sumur dimasukkan DNA ladder yang berfungsi sebagai penanda (marker). Elektroforesis kembali menggunakan *buffer* TAE 1x dengan voltase 100 V selama 30 menit.

Hasil dari proses isolasi DNA eksplan *Eucalyptus pellita* yang dilakukan kemudian diuji kualitasnya menggunakan gel agarose. Harahap (2014) menyatakan uji kualitatif terhadap sampel DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 0,8%. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA yang diperoleh.

Untuk mendeskripsikan lebih jelas kelompok hasil mutasi yang diduga sudah memiliki DNA yang berbeda dengan tanaman kontrol maka dilakukan uji kemiripan DNA pada dendogram menggunakan program NTSYSpc 2.20.

3.4. Analisis Data

Analisis data dilakukan terhadap data yang diperoleh berasal dari hasil pemotretan gel hasil RAPD berupa pita-pita diskrit dengan ukuran tertentu dari masing-masing sampel eksplan yang diujikan. Kemudian dilakukan *scoring* pita secara biner pada setiap lokus, dimana setiap pita yang tampak diberi nilai 1 dan yang tidak ada pita diberi nilai 0. Analisis data dilakukan menggunakan metode *Unweighted Pair-group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) versi 2.00 (Rohlf *et al.*, 1998).

Lokus	Individu					
	1	2	3	4	5	6
L-1	—		—		—	—
L-2		—	—	—		—

Lokus	Individu					
	1	2	3	4	5	6
L-1	1	0	1	0	1	1
L-2	0	1	1	1	0	1

Gambar 3.3. Skoring Pola Pita

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.